

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Nachweis
von
Mycoplasma pneumoniae

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Winnie Wai Meng LAM aus Hongkong, Kowloon

Mainz 1974

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Nachweis
von
Mycoplasma pneumoniae

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Winnie Wai Meng L A M aus Hongkong, Kowloon

Mainz 1974



Fachbereichsdekan: Professor Dr. Klein

Referent: Professor Dr. W. Bredt

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Erdmann

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Problemstellung	5
Material und Methoden	6
Untersuchungsmaterial	6
Mycoplasmen	6
Nährböden	7
Deckglaskammern	8
Verarbeitung der Rachenabstriche	8
Auswertung	9
Fluoreszenzserologische Untersuchung	10
Statistische Methoden	10
Ergebnisse	12
Untersuchungen an klinischem Material	12
Untersuchungen an künstlich infizierten Abstrichen	13
Diskussion	18
Zusammenfassung	24
Literatur	26



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON MYCOPLASMA

PNEUMONIAE

Einleitung

Von NOCARD, ROUX et al. wurde 1898 der Erreger der bovinen Pleuropneumonie, Mycoplasma mycoides, erstmals in zellfreiem Medium gezüchtet. In den folgenden Jahrzehnten sind von Mensch und Tier noch zahlreiche weitere Mycoplasma-Arten isoliert worden. Mycoplasmen werden derzeit als bakterienähnliche Mikroorganismen angesehen, die durch folgende Eigenschaften charakterisiert sind (Bak and Black 1968, Hayflick and Chanock 1965, Smith 1971):

1. Sie besitzen keine starre Zellwand, sondern sind nur von einer dreischichtigen Cytoplasma-Membran umgeben. Sie sind daher völlig resistent gegen zellwandwirksame Antibiotica, z.B. gegen Penicillin.
2. Sie benötigen, mit Ausnahme der Acholeplasmen, zum Wachstum Sterole und natives Protein.
3. Sie wachsen auf Agarnährböden in typischen spiegeleiförmigen Kolonien.
4. Ihr Wachstum wird durch homologe Antikörper gehemmt.
5. Ihre Desoxyribonukleinsäure hat einen GC-Gehalt von etwa 20–35%.
6. Das Genom der Mycoplasmen hat eine Größe von etwa 5×10^8 Daltons, das der Acholeplasmen eine solche von etwa 1×10^9 Daltons.

7. Im Gegensatz zu den ebenfalls zellwandlosen oder zellwanddefekten bakteriellen L-Formen (McGee et al. 1967) stammen Mycoplasmen nicht von Bakterien ab und können sich auch nicht in solche zurück verwandeln.

Mycoplasmen gewannen als Krankheitserreger zunächst nur in der Veterinärmedizin Bedeutung. Erst 1936 wurden sie erstmals aus einem pathologischen Prozeß beim Menschen isoliert (Dienes and Edsall 1937), und erst 1962 konnte eine Mycoplasma-Art (Mycoplasma pneumoniae) mit einem bestimmten menschlichen Krankheitsbild in Verbindung gebracht werden (Chanock, et al. 1962). Inzwischen sind mehrere Species bekannt, die von den Schleimhäuten des Menschen häufig isoliert werden können (Hayflick and Chanock 1965): Mycoplasma hominis und Mycoplasma fermentans aus dem Urogenitaltrakt, Mycoplasma orale 1, 2 und 3 sowie Mycoplasma salivarium aus dem Respirationstrakt. Dazu kommen die wegen ihrer kleinen ("tiny") Kolonien als T-Mycoplasmen bezeichneten harnstoffspaltenden Stämme, die überwiegend im Urogenitaltrakt gefunden werden.

Die genannten Species wurden sowohl von Gesunden als auch von Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern isoliert. Der klinisch und experimentell gesicherte Beweis eines Zusammenhangs zwischen einer Mycoplasma-Species und einem bestimmten Krankheitsbild - einer Form der primär atypischen Pneumonie (paP) - gelang bisher nur für M.pneumoniae (Chanock, Hayflick and Barile 1962,

Chanock et al. 1963). Dieser Erreger kann Erkrankungen des Respirationstraktes von der leichten inapparenten Infektion bis hin zur Bronchopneumonie hervorrufen (Hayflick 1969). Die Symptome der Erkrankung - Husten, Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost - können teilweise recht schwer sein (Chanock, Rifkind 1961). Als Komplikationen oder Folgeerkrankungen einer Mycoplasma-Pneumonie wurden beschrieben Myringitis und Otitis media (Rifkind et al. 1962, Sobeslavsky et al. 1965), Gelenkschwellungen (Lambert 1968), Stevens-Johnson-Syndrom (Sanders, Johnson 1971), akute cerebellare Ataxie (Steele 1972) und weitere zentralnervöse Erscheinungen (Meyers, Hirschman 1972, Sterner, Biberfeld 1969).

Die mikrobiologische Diagnose der durch M.pneumoniae hervorgerufenen Erkrankungen kann serologisch oder durch den kulturellen Nachweis des Erregers geführt werden. Der Nachweis spezifischer Antikörper gelingt meist erst eine Woche nach Ausbruch der Erkrankung oder später (Bredt 1970). Die serologische Diagnose hat daher ihre wesentliche Bedeutung bei den vielfältigen Folgeerkrankungen und bei epidemiologischen Fragestellungen. Bei der akuten Erkrankung des Respirationstraktes gelingt häufig die Isolierung des Erregers aus Sputum oder Rachenabstrich. Anzüchtung und Identifizierung erfordern jedoch mindestens 5 - 7 Tage (Bredt 1972) und können daher ebenfalls wenig zur Diagnostik der akuten Krankheitsphase beitragen.

Die Diagnose einer M.pneumoniae-Pneumonie und die Abgrenzung von den sehr ähnlichen Viruspneumonien führt zu therapeutischen Konsequenzen, da Mycoplasmen gegen mehrere Antibiotika empfindlich sind. Ein schneller Erregernachweis erscheint demnach wünschenswert. Entsprechende direkte Untersuchungen des klinischen Materials mit fluorescein-markierten Antikörpern zeigten nur eine begrenzte Brauchbarkeit (Hers and Masurel 1967).

Da M.pneumoniae sich langsam vermehrt (Bredt 1968 c), können die Koloniebildung auf Agarmedium oder die Zuckerspaltung in diphasischen bzw. flüssigen Medien nicht wesentlich beschleunigt werden. Ein schnellerer Nachweis dagegen müßte möglich sein, wenn nach kürzerer Bebrütungszeit schon wenige Zellen von M.pneumoniae mit dem Mikroskop gefunden und identifiziert werden könnten.

Vor einigen Jahren war von SOMERSON et al. (1967) nachgewiesen worden, daß M.pneumoniae bei Wachstum in flüssigem Medium gut an Glas haftet. In phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, daß M.pneumoniae an Glas charakteristische Zellformen ausbildete (Bredt 1968 a, b), die durch Zweiteilung und gleitende Fortbewegung entstanden (Bredt 1968 c). Diese Zellen konnten fluoreszenzserologisch als M.pneumoniae identifiziert werden und waren von den Zellen anderer Mycoplasma-Arten deutlich zu unterscheiden. Es lag nahe, diese Eigenschaft hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit für diagnostische Zwecke zu untersuchen. Dazu mußte

das zu untersuchende Material in flüssiges Nährmedium gebracht und in Kulturgefäßen inkubiert werden, die jederzeit eine mikroskopische Beobachtung erlaubten. Geeignet dafür erwiesen sich die schon für morphologische Studien verwendete Deckglaskammern (Bredt 1968 a). In derartigen Kammern setzten sich die Zellen von M.pneumoniae am unteren Deckglas fest und waren dort anhand ihrer typischen Form leicht zu identifizieren. In einer orientierenden Studie (Bredt und Matissek 1972) konnte so dreimal die Diagnose M.pneumoniae in 2 - 5 Tagen gestellt werden.

Problemstellung

1. An einer größeren Patientenzahl soll durch gleichzeitige Untersuchung von Rachenabstrichen mit konventionellen Methoden (Agarmedien, diphasisches Medium) und mikroskopischem Verfahren die Brauchbarkeit, Schnelligkeit und Zuverlässigkeit dieses Verfahrens geprüft werden.
2. Gleichzeitig sollen derartige Untersuchungen an künstlich infizierten Rachenabstrichen durchgeführt werden. Dabei soll mit unterschiedlichen Keimzahlen und verschiedenen Stämmen von M.pneumoniae gearbeitet werden, um die Einflüsse verschiedener Faktoren auf Nachweisgeschwindigkeit und -genauigkeit prüfen zu können.

Material und Methode

1. Untersuchungsmaterial

a) **Klinisches Material:** Untersucht wurden von Oktober 1971 bis März 1972 und von Oktober 1972 bis Februar 1973 die Rachenabstriche von insgesamt 120 Patienten mit Erkrankungen des Respirationstraktes. 90 der Patienten waren Kinder im Alter von 2 bis 13 Jahren. 45 dieser Proben wurden in der Universitätsklinik Mainz entnommen, 45 der Proben stammten aus der pädiatrischen Fachpraxis von Dr. Callensee. Die Proben der Erwachsenen stammten zur Hälfte aus der 2. Med. Klinik Mainz und zur anderen Hälfte von Studenten und Personal des Institutes für medizinische Mikrobiologie. Die Abstriche wurden nach der Entnahme sofort in 2 ml des flüssigen Mediums gegeben und innerhalb von 2 Stunden (die auswärtigen Proben nach 6 - 12 Stunden) verarbeitet.

b) **Experimentelles Material:** Pro Versuch wurden 12 Rachenabstriche von der gleichen gesunden Versuchsperson entnommen und in jeweils 2 ml des flüssigen Mediums ausgedrückt. Nach Entfernen des Watteträgers wurden dem Medium bestimmte Konzentrationen verschiedener Stämme von M.pneumoniae zugesetzt.

2. Mycoplasmen

Für die Versuche mit künstlich infizierten Rachenabstrichen wurden 3 Stämme von M.pneumoniae verwendet: FH, R6 und R54. Stamm

FH ist ein Laborstamm, der seit Jahren auf zellfreien Medien gehalten wird. Die Stämme R6 und R54 wurden in eigenen Untersuchungen aus Rachenabstrichen infizierter Personen isoliert und als M.pneumoniae identifiziert. Die Stämme wurden in flüssigem Medium angezüchtet, durch ein Nucleopore-Filter (0,4 µm) filtriert und in kleinen Mengen bei -20°C eingefroren. Die Zahl der koloniebildenden Einheiten (kbE/ml) wurde nach dem Einfrieren durch Verdünnung und Aussaat auf Agarmedium kontrolliert.

3. Nährböden

Verwendet wurden flüssige, feste und diphasische Nährmedien. Das flüssige Medium setzte sich entsprechend den Angaben von HAY-FLICK (1965) zusammen aus:

70 ml	PPLO-Agar (Difco Laboratories)
20 ml	Pferdeserum (Microbiological Associates)
10 ml	Hefeextrakt (25%ig)
1 ml	Penicillin (1 Mill. E/ml)
1 ml	Thalliumacetat (5%ig)
1 ml	Phenolrot (0,2%ig)

Das Agarmedium hatte folgende Zusammensetzung:

70 ml	PPLO-Agar (Difco Laboratories)
20 ml	Pferdeserum (Microbiological Associates)
10 ml	Hefeextrakt (25%ig)
1 ml	Penicillin (1 Mill. E/ml)
1 ml	Thalliumacetat (5%ig)

Von dem Agarmedium wurden jeweils 5 ml in Plastik-Petrischalen (60 x 10 mm) gegeben. Das Dextrose-Agarmedium hatte die gleiche Zusammensetzung, enthielt jedoch zusätzlich noch 1% Glukose.

Für das diphasische Medium (Allen et al. 1967) wurde zunächst jeweils 1 ml Agarmedium in kleine Röhrchen (mit Schraubverschluß) gegeben, dazu wurden jeweils 2 ml des flüssigen Mediums gegeben, dem noch 1% Glukose und 0,002% Methylenblau (Endkonzentrationen) (Kraybill and Crawford 1965) zugesetzt worden waren. Das pH der fertigen Medien betrug jeweils ca. 7,2-7,5.

4. Deckglaskammern

Für die mikroskopische Untersuchung wurden Deckglaskammern verwendet (Bredt 1968 a, b). Die Kammern wurden hergestellt, indem auf einem Deckglas (22 x 22 mm) ein Glasring (Höhe 2 - 3 mm, Durchmesser 10 mm) aufgesetzt wurde. Ring und Deckglas wurden durch Silikonfett (mittel viskös, Bayer) miteinander verbunden. Der freie obere Rand des Ringes wurde ebenfalls mit Silikonfett beschichtet. Nach dem Sterilisieren (180°C, 60 min.) waren die Kammern gebrauchsfertig. Nach Einfüllen des zu untersuchenden Ansatzes (ca. 0,2 ml) wurden die Kammern mit einem sterilen Deckglas (18 x 18) verschlossen.

5. Verarbeitung der Rachenabstriche

Von jeder Abstrichsuspension wurden auf 2 Agarplatten jeweils

0,05 ml aufgetropft. Von der gleichen Suspension wurden 0,1 ml in das diphasische Medium gegeben, außerdem wurden 3 Deckglaskammern mit jeweils 0,2 - 0,25 ml gefüllt. Der Rest der Suspension wurde ebenso wie die übrigen Ansätze bei 37⁰ C bebrütet. Von den Agarplatten wurde eine aerob und die zweite anaerob unter einer Atmosphäre von 95 % Stickstoff und 5 % Kohlendioxyd bebrütet. Die anaerobe Inkubation erfolgte in einem BTL-Anaeroben Topf. Bei den Versuchen mit künstlich infizierten Rachenabstrichen kamen noch 2 glukosehaltige Agarplatten hinzu. Es wurden dann jeweils 2 Agarplatten, eine mit Glukose und eine ohne Glukose, aerob und anaerob bebrütet.

6. Auswertung

Die Agarplatten wurden vom 3. bis 10. Tag täglich im Plattenmikroskop auf das Vorhandensein von verdächtigen Kolonien geprüft. Derartige unter aeroben Bedingungen gewachsene Kolonien wurden anhand der Glukosespaltung und durch den Wachstumshemmtest mit Antiserum-getränkten Filterpapierplättchen (Clyde 1964) identifiziert. Die anaerob gewachsenen Kolonien wurden, soweit kein Verdacht auf M.pneumoniae bestand, nicht weiter beobachtet.

Die Farbe des diphasischen Mediums wurde vom 2. Tag ab täglich kontrolliert. Bei einem entsprechenden Farbumschlag nach Gelb wurden Subkulturen angesetzt und anschließend mit dem Wachstumshemmtest die Identifizierung durchgeführt.

Die Deckglaskammern wurden bis zum 5. Tag täglich im Phasenkontrastmikroskop (Zeiss-Fotomikroskop, Kondensor mit 7 mm Arbeitsabstand) für mindestens 4 Minuten auf das Vorhandensein von verdächtigen Zellen am Glas durchgesehen.

7. Fluoreszenzserologische Untersuchung

Deckglaskammern wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten geöffnet und nach Entfernen des Mediums mit 0,1 ml eines 1 : 20 verdünnten, fluoresceinmarkierten Anti-M.pneumoniae-Serums (Baltimore Biological Laboratories) gefüllt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Kammern dreimal mit phosphatgepuffelter Kochsalzlösung (pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Ringe entfernt und die behandelten Deckgläser auf Objektträger gelegt. Die Untersuchung wurde an einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

8. Statistische Methoden

1. Die Werte wurden graphisch in einem Strichdiagramm aufgetragen.
2. Zur Prüfung der Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden (mikroskopischen Verfahren, diphasischen Medien, Agarkulturen) wurde ein Simultanvergleich durch den FRIEDMAN-Test (Sachs 1971) durchgeführt. Die Einzelunterschiede wurden danach mit dem Ausschlußtest nach WILCOXON und WILCOX

(Sachs 1971) geprüft.

3. Zum Vergleich verschiedener Keimzahlen bei gleichem Stamm und gleicher Methodik wurde der Test nach DWAS und STEELE (Miller 1966) benutzt.
4. Etwaige Unterschiede zwischen dem Laborstamm FH und den beiden Wildstämmen (R_6 und R_{54}) wurden mit dem WILCOXON-Test für unverbundene Stichproben (wissenschaftliche Tabellen Geigy 1969) geprüft.

Ergebnisse

1. Untersuchungen an klinischem Material

Insgesamt wurden 120 von Patienten gewonnene Rachenabstriche verarbeitet. Die klinische Diagnosen sind in Tabelle I aufgeführt.

Von diesen 120 Abstrichen wurde nur in 3 Fällen M.pneumoniae gezüchtet.

Fall R6 stammte von einem 7-jährigen Knaben, der akut an einer Pneumonie erkrankt war. Er lag zuerst 8 – 10 Tage zu Hause. Bei der Aufnahme in die Kinderklinik wurde er sofort mit Erythromycin behandelt. Der Rachenabstrich wurde 24 Stunden nach der Aufnahme entnommen.

Mikroskopisch wurden keine M.pneumoniae-verdächtigen Strukturen entdeckt. Im diphasischen Medium trat nach 14 Tagen ein Farbumschlag auf (Tabelle 2). Auf den aerob bebrüteten Agarplatten waren am 14. Tag 50 Kolonien zu sehen, deren Aussehen auf M.pneumoniae hinwies. Subkulturen wurden sofort von allen drei Medien durchgeführt. Die Subkulturen zeigten in den Deckglaskammern bereits nach 24 Stunden zahlreiche M.pneumoniae-verdächtige Strukturen. Die Keime spalteten Glukose, reduzierten Methylenblau und zeigten im Wachstumshemmtest mit Anti-M.pneumoniae-Serum einen deutlichen Hemmhof. Sie konnten somit als M.pneumoniae identifiziert werden.

Zwei Rachenabstriche, R39 und R54, aus denen M.pneumoniae gezüchtet wurde, stammten von zwei Medizinstudenten. Beide hatten ca. 14 Tage lang einen grippeähnlichen Infekt mit Reizhusten, leichter Temperaturerhöhung und einem starken Krankheitsgefühl. Diese Krankheitssymptome verschwanden ohne antibiotische Therapie nach etwa zwei Wochen.

Bei Material R39 konnten mikroskopisch keine M.pneumoniae-Fäden gefunden werden (Tabelle 2). Der Farbumschlag im diphasischen Medium erfolgte am 18. Tag. Bei Material R54 waren bereits am 2. Tag unter dem Mikroskop verdächtige Strukturen zu sehen. Der Farbumschlag des diphasischen Mediums erfolgte hier am 7. Tag. Ebenfalls am 7. Tag waren auf den Agarplatten (aerob und anaerob) Kolonien gewachsen. Die Keime zeigten die gleichen Eigenschaften wie bei Material Nr.R6 und wurden ebenfalls als M.pneumoniae identifiziert.

Andere Mycoplasma-Species außer M.pneumoniae wurden insgesamt 22 mal gefunden. In den ersten 69 Rachenabstrichen wurden 5 mal M. orale 1 und 6 mal M. salivarium identifiziert. Später wurde diese Identifizierung unterlassen, sobald bestimmte Kriterien vermuten ließen, daß es sich nicht um M.pneumoniae handelte. Folgende Merkmale wurden bewertet: Wachstum typischer Kolonien innerhalb weniger Tage nur auf anaeroben Platten, die in Wachstumsgeschwindigkeit und Größe nicht M.pneumoniae glichen, keinerlei Hinweis auf M.pneumoniae im mikroskopischen Verfahren, in diphasischem Medium und auf den aerob bebrüteten Platten.

2. Untersuchungen an künstlich infizierten Rachenabstrichen

Für diese Untersuchungen wurden der Laborstamm M.pneumoniae FH und die zwei von Patienten isolierten Wildstämme R6 und R54 verwendet. Die beiden Wildstämme befanden sich in der 3. Passage.

Von diesen Stämmen wurden den in Medium ausgedrückten mycoplasmafreien Rachenabstrichen jeweils 10^2 , 10^3 oder 10^4 koloniebildende Einheiten pro ml (kbE/ml) zugesetzt. Mit dem Stamm FH wurde noch ein Versuch mit 10^5 kbE/ml durchgeführt. Jeder Versuch umfaßte 12 Parallelansätze. Für jede Untersuchungsmethode wurde der Tag des ersten positiven Befundes notiert. Tabelle 3 zeigt ein typisches Versuchsprotokoll.

Für den mikroskopischen Nachweis wurden die Kammern täglich vom ersten bis zum fünften Tag im Phasenkontrastmikroskop (Objektiv Ph 100 Apochromat Öl, Optovar 1,25, Okular Kpl 10 x) mindestens je vier Minuten durchgemustert. Nach fünf Tagen waren viele Kammern wegen erheblicher Blasenbildung nicht mehr brauchbar. Zwischen dem 1. und 4. Bebrütungstag fanden sich neben Zelltrümmern und Bakterien die für M.pneumoniae typischen Strukturen. Sie waren zu sehen als kleine punktförmige oder tropfenförmige Gebilde mit fadenförmiger Verlängerung. Das Ende des Armes wies häufig eine Verdickung auf (Abb. 1). Manche Strukturen bestanden auch aus zwei oder drei verzweigten Zellen (Abb. 1). Gelegentlich fanden sich auch kolonieähnliche Haufen, von denen fadenförmige Gebilde ausgingen (Abb. 2).

Der gelbe Farbumschlag des diphasischen Mediums erfolgte durchschnittlich zwischen dem 5. und 17. Tag. Der Umschlag begann meist an der Grenze zwischen der flüssigen und festen Phase und schritt

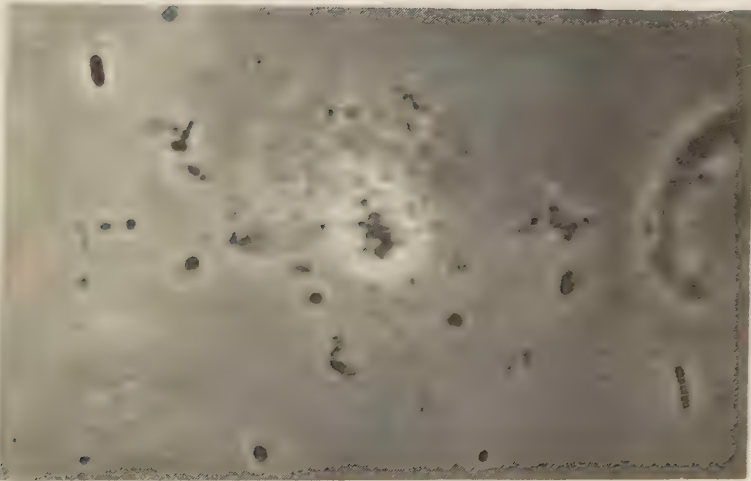


Abb. 1 und 2: Rachenabstrich, infiziert mit M.pneumoniae FH (10^4 kbE/ml),
nach 24 Std. Bebrütung in flüssigem Medium.
Vergrößerung 2560 x.

nach oben und unten fort. Nach einigen Tagen ging die Farbe im flüssigen Bereich vom Gelb nach Blaugrün zurück, während die Agarphase die gelbe Farbe beibehielt.

Die Kolonien auf den Agarplatten mit oder ohne Dextrose waren frühestens am 4. Tag unter dem Mikroskop sichtbar. Durchschnittlich wurden sie zwischen dem 4. und 9. Tag entdeckt. Die Koloniezahlen der einzelnen Ansätze variierten bei der gleichen Versuchsreihe erheblich. Die Koloniezahl entsprach bei manchen Ansätzen der Zahl der inokulierten kbE, bei anderen Ansätzen zeigte sich eine Verminderung bis zu einer Zehnerpotenz. Zwischen den Agarmedien mit und ohne Dextrose bestanden hinsichtlich der Koloniezahl und -größe keine deutlichen Unterschiede.

Die Werte über den Zeitpunkt des Positivwerdens aller Verfahren sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Tabelle 4 zeigt, daß der Zeitpunkt des Nachweises bei allen drei Stämmen von der Keimzahl abhängig ist.

Die Einzelwerte über den Zeitpunkt des Positivwerdens aller Verfahren sind in Form eines Strichdiagrammes (Abb. 3 a - c) aufgetragen.

Bei simultanem Vergleich aller drei Methoden ergibt sich ein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse des anschließenden Einzelvergleiches sind in Tabelle 5 dargestellt. Sie zeigt, daß zwischen mi-

kroskopischem Verfahren und diphasischem Medium stets ein signifikanter Unterschied besteht. Bei dem Vergleich des mikroskopischen Verfahrens mit der Agarkultur läßt sich ein solcher Unterschied nicht immer sichern. Vergleicht man jedoch die beiden letztgenannten Methoden auf dem Strichdiagramm, so zeigt sich, daß von 10 Versuchen nur einmal das Positivwerden auf den gleichen Tag fiel, in 9 Fällen konnte das Ergebnis des mikroskopischen Tests um mindestens einen Tag früher abgelesen werden. Dieser Zeitunterschied erwies sich bei der isolierten Betrachtung der beiden Methoden im Wilcoxon-Test als signifikant ($2 \alpha \leq 0,01$).

In einer weiteren Berechnung wurde geprüft, inwieweit die Nachweisgeschwindigkeit innerhalb der gleichen Methode von der Höhe des Inoculums abhing. Dazu wurden Werte mit unterschiedlichen Keimzahlen bei gleichem Stamm und gleicher Methode einander gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Es zeigt sich, daß Mikroskopie und diphasisches Medium bei allen Stämmen in niedrigen Keimzahlen meist deutlich spätere Werte aufweisen als bei höheren Einsaaten. Beim Agarmedium bestanden in einigen Fällen höherer Konzentrationen ebenfalls keine Unterschiede. Die Ergebnisse der Tabelle 6 zeigen, daß bei hoher Keimzahl in allen Methoden der Nachweis früher erfolgt als bei niedrigem Inoculum.

In einem weiteren Abschnitt wurden eventuell bestehende Unter-

schiede zwischen den Werten des Laborstammes und denen der Wildstämme untersucht. Dazu wurden die Ergebnisse der Stämme bei gleicher Keimzahl und Methodik einander gegenübergestellt (Tabelle 7).

Aus Tabelle 6 ergibt sich, daß im mikroskopischen Verfahren der Laborstamm bei der niedrigsten Konzentration etwas langsamer war als der Wildstamm R54. Bei den zwei niedrigsten Konzentrationen zeigte der Stamm FH auch auf Agarmedium spätere Ergebnisse. Bei dem diphasischen Medium wurden die Ansätze des Laborstammes bei allen Konzentrationen später positiv als die beiden Wildstämme (1 - 2 Tage).

Insgesamt hat die mikroskopische Methode bei den 120 Ansätzen viermal versagt, das diphasische Medium dreimal und das Agarmedium ebenfalls dreimal. Davon sind jeweils zwei Versager allerdings auf die Ansätze E8/7 und E8/8 zurückzuführen, die in allen Methoden negativ waren. Nach Abzug dieser Ansätze haben in 118 Ansätzen das mikroskopische Verfahren zweimal, Agarmedium und diphasisches Medium jeweils einmal versagt.

Eine orientierende fluoreszenzserologische Untersuchung der bewachsenen Deckgläser erwies sich als umständlich und brachte keine besseren Ergebnisse. Sie wurde daher nicht weiter durchgeführt.

Diskussion

Aus den insgesamt 120 in Mainz untersuchten Proben von Patienten mit respiratorischen Infekten konnte nur dreimal (2,3%) M.pneumoniae isoliert werden. Bezogen auf die Zahl der Pneumonien waren es ebenfalls nur 3% (1 Isolierung aus 31 Fällen). Diese Zahl steht im erheblichen Gegensatz zu der von amerikanischen und skandinavischen Autoren angegebenen Isolierungsquote (bis zu 39% aller Pneumoniefälle) (Forsyth and Chanock 1966, Lind 1971, Lind et al. 1970). Zur Erklärung dieser geringen Frequenz von M.pneumoniae können zwei Möglichkeiten herangezogen werden. Einmal könnte in der Bundesrepublik die ambulante Behandlung derartiger Infekte durch Hausbesuche häufiger sein als in den Vergleichsländern. Nur wenige Patienten mit schwereren Krankheitsverläufen würden also in das Krankenhaus kommen. Die ambulanten Patienten wurden in das Programm einbezogen, um diese eventuelle Selektion zu umgehen. Eine zweite Ursache der wenigen Isolierungen kann in der epidemiologischen Situation liegen. Infektionen mit M.pneumoniae sollen in bestimmten Jahren gehäuft vorkommen, während in anderen Jahren vergeblich nach diesen Erregern gesucht wird. So wurden in den Jahren 1957 - 1959 im Children Hospital in Washington 10% aller Erkrankungen des unteren Respirationstraktes als M.pneumoniae-Infektionen diagnostiziert (Forsyth, Chanock 1966). 1962 bis 1964 dagegen betrug die Häufigkeit nur 1% (Forsyth, Chanock 1966).

Möglicherweise wurden unsere Untersuchungen in den Wintern 1971/72 und 1972/73 in einem solchen epidemiologischen Tal durchgeführt.

Das Ergebnis von nur drei M.pneumoniae-Fällen läßt eine Aussage über den Wert von Nachweismethoden nicht zu. Im folgenden Abschnitt wird daher nur über die Ergebnisse der experimentell infizierten Rachenabstriche diskutiert.

Die aufgeführten Ergebnisse der experimentell infizierten Rachenabstriche zeigen, daß die Nachweisgeschwindigkeit bei allen Methoden entscheidend von der Zahl der im Untersuchungsmaterial enthaltenen Keime abhängt. Der Zeitpunkt des ersten positiven Nachweises lag für die konventionellen Methoden der Isolierung auf Agarmedium mit 4 bis 7 Tagen im Bereich der von anderen Autoren gefundene Werte. So benötigten KUNDSIN und PRAZNIK (1967) sowie NEU und ELLNER (1969) durchschnittlich 7 Tage. Die relativ frühen Werte (4 Tage) der eigenen Ergebnisse erklären sich unter Umständen aus der Erfahrung des Untersuchers, der intensiven Beobachtung und der Tatsache, daß dem Untersucher das Vorhandensein von *Mycoplasmen* bekannt war.

Für den Farbumschlag im diphasischen Medium wurden 4 bis 14 Tage benötigt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von ALLEN et al. (1967) überein, die ein Positivwerden des diphasischen Mediums oft erst nach 14 Tagen oder später beobachteten. Zu den für Agar-

medium und diphasisches Medium genannten Isolierungszeiten muß dann noch derjenige Zeitraum hinzugerechnet werden, der für eine Identifizierung der verdächtigen Kolonien auf Agar oder die Anzüchtung der Erreger aus dem diphasischen Medium benötigt wird. Relativ unspezifisch kann die Identifizierung der Kolonien durch einen Hämolyse-Test innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden (Chanock et al. 1962). Eine sichere Bestimmung der Keimart ist allerdings nur serologisch möglich. Dies geschieht meist mit dem Wachstumshemmtest (Clyde 1964), dessen Ergebnis erst nach mehreren Tagen vorliegt. Die direkte fluoreszenzserologische Anfärbung der Kolonien auf Agar (Del Giudice et al. 1967) dauert nur Stunden, erfordert jedoch einen gewissen Aufwand an Material und Ausrüstung. Anzüchtung und Isolierung der Keime aus diphasischem Medium erfordern ebenfalls mehrere Tage.

Im Gegensatz zu den für konventionelle Methoden benötigten Zeitspannen können die Erreger mit der mikroskopischen Methode innerhalb einer wesentlich kürzeren Zeit (1 bis 5 Tage) isoliert und identifiziert werden. Beim Vorliegen einer entsprechenden Keimdichte kann die Untersuchung nach 2 bis 3 Tagen abgeschlossen werden. Die wenigen bisher an klinischem Material erhobenen Befunde lassen im Vergleich mit unseren experimentellen Ergebnissen Keimzahlen von 10^4 /ml durchaus möglich erscheinen (Bredt, Matissek 1972).

Der mikroskopische Nachweis verdächtiger Zellen in einer Deckglaskammer erlaubt bei entsprechender Kenntnis eine weitgehend sichere Diagnose, da M.pneumoniae bisher die einzige Mycoplasma-Art ist, deren Zellen die beschriebenen charakteristischen Strukturen bilden (Bredt 1968 b, c). Im Zweifelsfalle kann die Diagnose an den gleichen Zellen innerhalb wenigen Stunden serologisch gesichert werden. Dies kann entweder durch fluoreszenzserologische Behandlung des bewachsenen Deckglases oder mittels der Zerstörung der Zellen durch spezifischen Antikörper geschehen (Bredt 1969; 1971).

Die Versagerquote des mikroskopischen Verfahrens liegt in unseren Untersuchungen mit zwei von 118 Ansätzen außerordentlich niedrig. Ähnliche Werte wurden in den gleichen Versuchsansätzen für die beiden konventionellen Verfahren gefunden. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der mikroskopische Nachweis von M.pneumoniae ausreichende Zuverlässigkeit und Spezifität besitzt. Es sollte allerdings stets zusammen mit einem der konventionellen Verfahren angewendet werden.

Der mikroskopisch - morphologische Nachweis von M.pneumoniae kann nach den bisherigen Erfahrungen in drei verschiedenen Verfahren eingesetzt werden.

1. Das zu untersuchende klinische Material kann direkt auf diese Weise in flüssigem Medium untersucht werden. Die Diagnose

kann dadurch schon sehr früh gestellt und gesichert werden. Dieses Verfahren bietet die meisten Vorteile, ist aber sicherlich auch mit dem größten Aufwand belastet. Außer Erfahrung und entsprechender Ausrüstung fällt hier besonders der Zeitfaktor ins Gewicht. Bei entsprechender Einsendungsanzahl benötigt die tägliche Durchmusterung aller Deckglaskammern sehr viel Zeit. Falls eine passende Phasenkontrasteinrichtung nicht vorhanden ist, kann die Suche nach den Mycoplasmen auch im Dunkelfeld oder fluoreszenz-serologisch erfolgen. Die Kammern können dabei allerdings nur jeweils einmal untersucht werden. Eine strenge klinische Auswahl ist Voraussetzung für diese Anwendung des Verfahrens.

2. Die mikroskopische Methodik kann auch für die schnellere Verarbeitung von verdächtigen diphasischen Kulturen eingesetzt werden. Dies kann geschehen, indem eine Subkultur in flüssigem Medium angelegt und in eine Deckglaskammer gegeben wird. Bei der zu erwartenden Keimdichte sind die Zellen schon nach 24 Stunden am Glas zu beobachten und können gegebenenfalls serologisch identifiziert werden. Dieses Verfahren spart den Weg über die Agar-Subkultur und verkürzt damit die Nachweisdauer um mehrere Tage.
3. Bei verdächtigen Kolonien auf Agarmedium können diese in flüssiges Medium gegeben und für einen Tag bebrütet werden. Wenn nach dieser Zeit aus der Subkultur ein Deckglaskammer gefüllt

wird, dürften sich nach weiteren 24 Stunden entsprechende Strukturen am Glas nachweisen und identifizieren lassen.

Die Anwendung des mikroskopischen Nachweises für M.pneumoniae wird begrenzt von den Faktoren Ausrüstung und Erfahrung. Sicherlich wird ein kleineres Labor mit gelegentlichen Einsendungen für diesen Erreger oder ein großes Labor ohne spezielles Interesse für die entsprechende Fragestellung nicht in der Lage sein, die notwendigen morphologischen Kenntnisse und die entsprechende mikroskopische Ausrüstung stets bereit zu halten. Hier sind die bisherigen bewährten Methoden der Kultur und Serologie völlig ausreichend. Andererseits bietet das mikroskopische Verfahren bei entsprechendem Interesse von Klinik und Laboratorium die Möglichkeit, einen Teil der sogenannten atypischen Pneumonien rechtzeitig zu diagnostizieren und einer gezielten Therapie zuzuführen. Das Verfahren bietet damit die Möglichkeit, zusätzlich zu den bisher erprobten Methoden den kulturellen Nachweis von M.pneumoniae zu beschleunigen. Die vorgelegten experimentellen Ergebnisse lassen dies als einen brauchbaren diagnostischen Weg erkennen. Die Erprobung an einem entsprechend großen klinischen Untersuchungsgut steht noch aus.

Zusammenfassung

An Rachenabstrichen von Patienten mit Infekten der oberen Luftwege und an künstlich infizierten Abstrichen sollte eine mikroskopische Methode zum Nachweis von Mycoplasma pneumoniae mit den konventionellen Verfahren hinsichtlich Schnelligkeit und Zuverlässigkeit des Erregernachweises verglichen werden. Das mikroskopische Verfahren beruht auf einem phasenkontrastmikroskopischen Nachweis der typischen M.pneumoniae - Zellen am Glas einer Deckglaskammer. In den 120 klinischen Abstrichen fanden sich nur drei positive Fälle, für eine Beurteilung der Verfahren war diese Zahl zu gering.

In insgesamt 13 Versuchen (je 12 Parallelansätze) wurden Rachenabstriche mit drei Stämmen von M.pneumoniae (1 Laborstamm, 2 frisch isolierte Stämme) in verschiedenen Keimzahlen ($10^2 - 10^5$) künstlich infiziert. Alle Abstriche wurden in flüssigem Medium in Deckglaskammern (mikroskopisches Verfahren), in einem diphasischen Medium und auf Agarmedium (mit und ohne Glukose) angesetzt. Die Ergebnisse zeigen, daß das mikroskopische Verfahren einen relativ frühen (ca. 2. Tag) Keimnachweis erlaubt, während die konventionellen Methoden (diphasisches Medium, Agar) frühestens ab 4. Tag eine Verdachtsdiagnose zulassen. Dieser Unterschied war besonders deutlich bei höheren Keimzahlen ($10^3 - 10^5$). Bei gleichem Stamm gelang der Nachweis stets schneller bei höheren

Keimzahlen. Zwischen Laborstamm und den beiden Wildstämmen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Das mikroskopische Verfahren des direkten Nachweises von einzelnen M.pneumoniae-Zellen in einer Deckglaskammer war damit hinsichtlich der Schnelligkeit der Diagnose den bisherigen Verfahren überlegen (2 Tage gegen 4 - 7 Tage). Es kann darüberhinaus in Kombination mit konventionellen Verfahren zur schnelleren Identifizierung von M.pneumoniae verwendet werden. Die Anwendung des mikroskopischen Verfahrens ist an bestimmte technische Voraussetzungen und entsprechende Kenntnisse gebunden, daher wird sie vorerst speziell interessierten Laboratorien vorbehalten bleiben müssen.

Diagnose	Zahl der Patienten
Bronchitis	48
Pneumonie	25
Bronchopneumonie	6
Nasen-Rachen-Infekte	7
Angina	5
Tracheitis	1
Grippale Infekte	7
Chronisches Emphysem	1
Croup	3
Bronchial Carcinom	1
Sonstige nicht respiratorische Infekte	16
Zusammen	120

Tabelle 1: Klinische Diagnosen der Patienten, von denen Rachenabstriche untersucht wurden.

Material Nr.	Mikroskop. Nachweis	Diphas. Medium	Agar aerob	Agar anaerob
	Tag des Positiven Nachweises			
R ₆	Ø	14	14 (50)	14 (2)
R ₃₉	Ø	18	17 (30)	Ø Ø
R ₅₄	2	7	7 (20)	7 (35)

Tabelle 2: Zusammenstellung der drei M.pneumoniae-positiven Fälle mit Tag des ersten positiven Nachweises in den drei verschiedenen Anzüchtungsverfahren. Zahl in Klammern: Koloniezahl auf Agarmedium.

$E_{10} R_{54/3}$ 10^4 kbE/ml	Kammer	diphas. Medium	Agar aerob	Agar aerob - Dextrose
$E_{10/1}$	2	6	6	7
$E_{10/2}$	2	5	4	5
$E_{10/3}$	3	5	5	4
$E_{10/4}$	3	5	5	5
$E_{10/5}$	2	4	4	5
$E_{10/6}$	1	4	5	5
$E_{10/7}$	2	4	4	4
$E_{10/8}$	2	5	5	5
$E_{10/9}$	3	5	4	4
$E_{10/10}$	3	5	5	4
$E_{10/11}$	1	5	4	5
$E_{10/12}$	3	5	6	5

Tabelle 3:

Versuch E_{10} mit M.pneumoniae Stamm R_{54}
 10^4 kbE/ml . Die Ziffern geben den Tag des
positiven Befundes bei dem jeweiligen Ansatz
und in der betreffenden Methode an (Tag
1 : 24 Stunden nach Beimpfen des Mediums).

Stamm	Keimzahl	Mikroskop. Methode	diphas. Medium	Agar ohne Glukose	Agar mit Glukose
FH	10^5	1,0 (1)	3,8 (3 - 4)	5,0 (5)	4,5 (4 - 5)
	10^4	2,5 (1 - 5)	5,9 (5 - 7)	5,3 (4 - 6)	5,0 (4 - 6)
	10^3	3,5 (1 - 5)	7,5 (7 - 8)	6,0 (5 - 7)	6,6 (6 - 8)
	10^2	5,2 (4 - 6)	14,4 (7 - 21)	6,8 (6 - 8)	7,0 (6 - 8)
R ₆	10^4	1,8 (1 - 2)	4,4 (4 - 6)	4,0 (4)	4,0 (4)
	10^3	2,7 (2 - 4)	5,0 (5 - 7)	4,0 (4)	4,4 (4 - 6)
	10^2	4,4 (2 - 8)	7,8 (7 - 9)	7,4 (6 - 9)	7,2 (6 - 8)
R ₅₄	10^4	2,3 (1 - 3)	4,8 (4 - 6)	4,8 (4 - 6)	4,8 (4 - 7)
	10^3	2,7 (2 - 5)	5,6 (4 - 7)	4,2 (4 - 5)	4,6 (4 - 6)
	10^2	4,3 (4 - 6)	7,3 (7 - 8)	5,4 (5 - 8)	5,5 (5 - 6)

Tabelle 4: Zeitpunkt des ersten positiven Befundes in den verschiedenen künstlich infizierten Ansätzen (Mittelwert). Zahlen in Klammern: Extremwerte des jeweiligen Versuchsansatzes. Wenige negative Befunde wurden vernachlässigt.

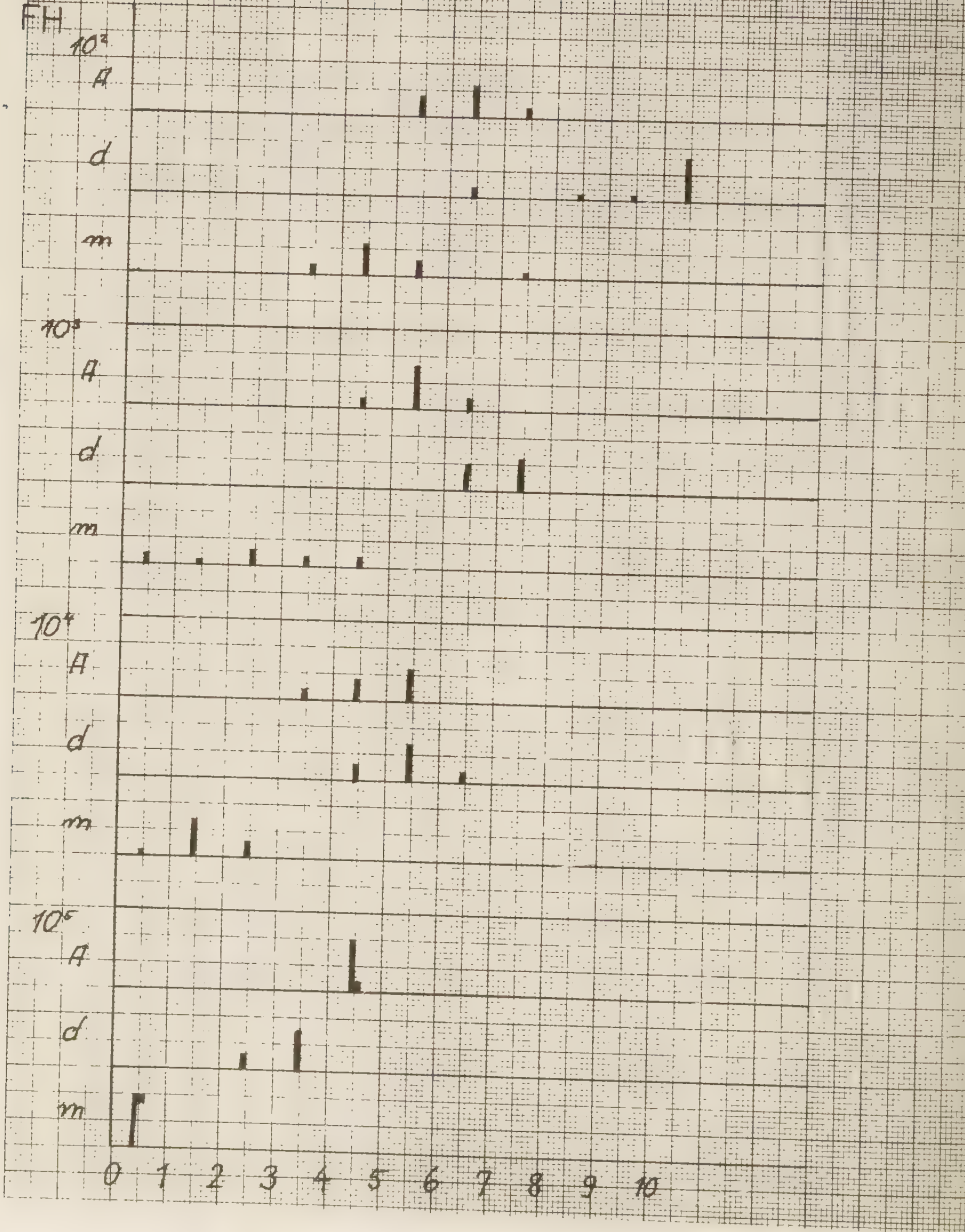


Abbildung 3a : Stamm FH, Darstellung der Einzelwerte.
1 mm Säulenhöhe zeigt das Positivwerden eines Ansatzes an.

A = Agarkultur; d = diphasisches Medium; m = mikroskopisches Verfahren; 10^4 usw. = Inoculum in koloniebildenden Einheiten / ml.

R₆

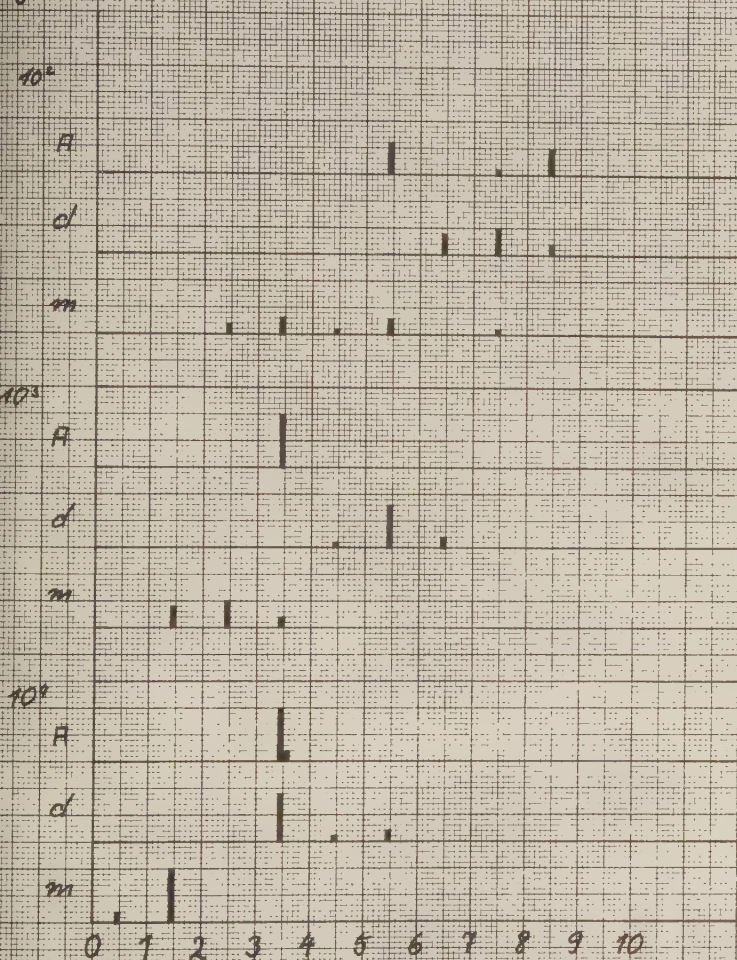


Abbildung 3b: Stamm R₆, Darstellung der Einzelwerte.
1 mm Säulenhöhe zeigt das Positivwerden eines Ansatzes an.

A = Agarkultur; d = diphasisches Medium; m = mikroskopisches
Verfahren; 10⁴ usw. = Inoculum in koloniebildenden Einheiten / ml.

R₅₄

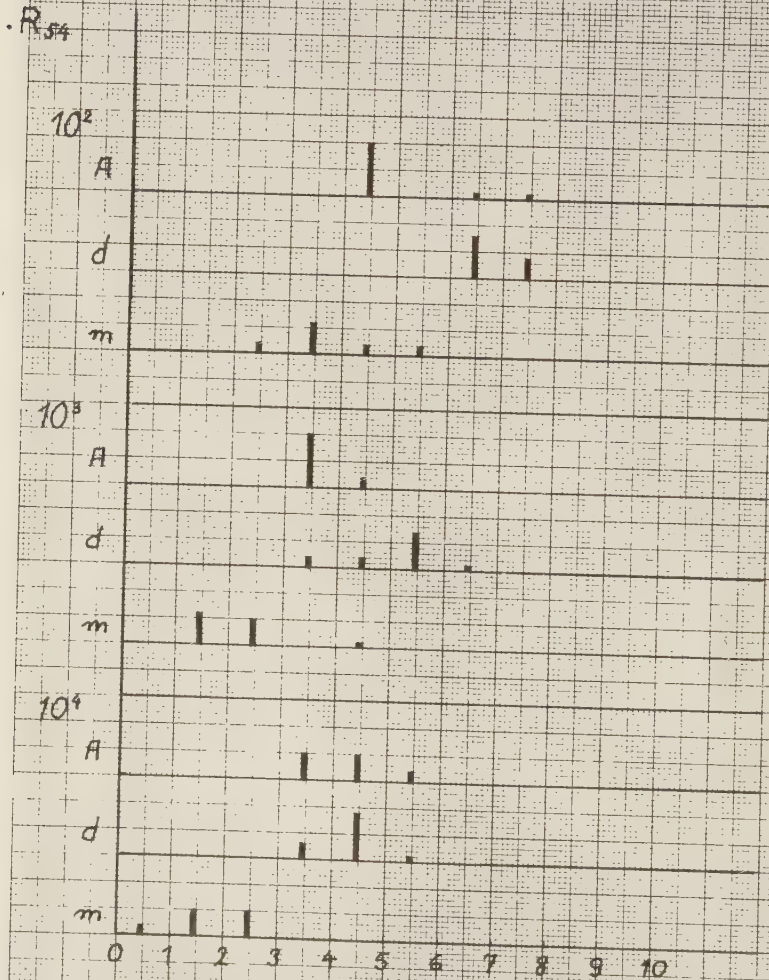


Abbildung 3c: Stamm R₅₄, Darstellung der Einzelwerte.
1 mm Säulenhöhe zeigt das Positivwerden eines Ansatzes an.

A = Agarkultur; d = diphasisches Medium; m = mikroskopisches Verfahren; 10^4 usw. = Inoculum in koloniebildenden Einheiten / ml.

Stamm	Keimzahl kbE/ml	mikroskop.Methode gegen diphas. Medium	mikroskop.Methode gegen Agarkultur	diphas.Medium gegen Agar- kultur
FH	10^4	s	s	ns
	10^3	s	ns	a
	10^2	s	ns	a
R6	10^4	s	s	ns
	10^3	s	ns	a
	10^2	s	a	ns
R54	10^4	s	s	ns
	10^3	s	ns	ns
	10^2	s	ns	a

Tabelle 5: Zweiseitiger Test nach Wilcoxon und Wilco $\times$ (in Anschluß an den Friedman-Test), angewendet für den Vergleich der jeweiligen Methoden innerhalb des gleichen Versuchsansatzes,

ns = nicht signifikant

s = signifikant ($p < 1\%$)

a = auffällig ($p < 5\%$)

Stamm	gegenüberge- stellte Keim- zahlen	mikroskop. Methode	diphasisches Medium	Agar- medium
FH	$10^2 - 10^3$	a	a	ns
	$10^2 - 10^4$	s	s	s
	$10^2 - 10^5$	s	s	s
	$10^3 - 10^4$	ns	s	ns
	$10^3 - 10^5$	s	s	s
	$10^4 - 10^5$	s	s	ns
R6	$10^2 - 10^3$	ns	s	s
	$10^2 - 10^4$	s	s	s
	$10^3 - 10^4$	a	s	ns
R54	$10^2 - 10^3$	s	s	a
	$10^2 - 10^4$	s	s	ns
	$10^3 - 10^4$	ns	ns	ns

Tabelle 6: Zeitpunkt des ersten positiven Befundes innerhalb der gleichen Methode und beim gleichen Stamm, jedoch mit unterschiedlicher Keimeinsaat. Vergleich im Test nach DWAS und STEEL.

ns = nicht signifikant

s = signifikant ($p < 1\%$)

a = auffällig ($p < 5\%$)

gegenüber- gestellte Stämme	geprüfte Keimzahl	mikroskop. Methode	diphasisches Medium	Agar- medium
FH-R6	$10^2 - 10^2$ $10^3 - 10^3$ $10^4 - 10^4$	$2 \alpha \leq$	$2 \alpha \leq$	$2 \alpha \leq$
		ns	0,05	ns
		ns	0,01	ns
		ns	0,01	ns
FH-R54	$10^2 - 10^2$	0,05	0,01	0,01
	$10^3 - 10^3$	ns	0,01	0,01
	$10^4 - 10^4$	ns	0,01	ns

Tabelle 7: Zeitpunkt des ersten positiven Befundes bei Laborstamm FH und den Wildstämmen R6 und R54 innerhalb der gleichen Keimeinsaat. Vergleich im Wilcoxon-Test für nicht verbundene Stichproben.

ns = nicht signifikant ($2 \alpha \leq 0,1$)

Literatur

- 1 ALLEN, V.S., SUELTSMANN, S., and DAWSON, Ch., 1967
Laboratory diagnosis of mycoplasma pneumonia in a Public
Health Laboratory.
Hlth.Lab. Sci. 4, 90-95
- 2 BAK, A.L. and F.T. BLACK, 1968
DNA Base composition of human T Strain mycoplasmas
Nature, (London) 219, 1044-1045
- 3 BREDT, W. 1968 a,
Growth morphology of Mycoplasma pneumoniae strain FH on
glass surface.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (N.Y.) 128, 338-340
- 4 BREDT, W. 1968 b,
Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen zu Morphologie
und Vermehrung von Mycoplasma pneumoniae an Glas.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 208, 549-562
- 5 BREDT, W. 1968 c,
Motility and multiplication of Mycoplasma pneumoniae. A phase
contrast study.
Path.Microbiol. (Basel) 32, 321-326
- 6 BREDT, W. 1969,
A microscopic test for rapid detection of antibodies against
Mycoplasma pneumoniae.
Experientia (Basel) 25, 436
- 7 BREDT, W. 1970
Serologische Diagnostik bei Mycoplasma Infektionen des Menschen.
Dtsch.Med.Wschr. 95, 234-237
- 8 BREDT, W. 1971
Cellular morphology of newly isolated Mycoplasma hominis strains.
J.Bacteriol. 103, 449-450

- 9 BREDT, W. 1972
Nachweismethoden bei Mycoplasma Infektionen.
Zbl.Bakt.Hyg. I.Abt.Orig. A. 220, 194-202
- 10 BREDT, W. und MATISSEK, U. 1972
Zur Brauchbarkeit morphologischer Verfahren für die Myco-
plasma-Diagnostik.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A. 222, 236-268
- 11 CHANOCK, R.M., HAYFLICK, L. and M.F. BARILE 1962
Growth on artificial medium of an agent associated with atypical
pneumonia and its identification as a PPLO.
Proc.Natl.Acad.Sci. 48, 41-49
- 12 CHANOCK, R.M., MUFSON, M.A., SOMERSON, N.L. and
R.B. COUCH 1963
Role of Mycoplasma (PPLO) in human respiratory disease.
Amer.Rev.Respirat.Diseas. 88, 218-231
- 13 CHANOCK, R.M., RIFKIND, D., KRACETZ, H.M., KNIGHT, V.
and K.M. JOHNSON 1961
Respiratory disease in volunteers infected with Eaton agent, a
preliminary report.
Proc.Natl.Acad.Sci. 47, 887-890
- 14 CLYDE, W.A.Jr. 1964
Mycoplasma species identification based upon growth inhibition
by specific antisera.
J.Immunol. 92, 958-965
- 15 DEL GIUDICE, R.A., ROBILLARD, N.F. and T.R. CARSDJ 1967
Immunofluorescence identification of Mycoplasma on agar by use
of incident illumination.
J.Bacteriol. 93, 1205-1209
- 16 DIENES, L. and J. EDSALL 1937
Observation on the L-organisms of Klieneberger.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (N.Y.) 36, 740-744

- 17 FORSYTH, B.R. and R.M. CHANOCK 1966
Mycoplasma pneumonia
Ann.Rev.Med. 17, 371-382
- 18 HAYFLICK, L. 1965
Tissue cultures and mycoplasmas
Texas Rep.Biol.Med., Suppl.1, 23, 285-303
- 19 HAYFLICK, L. (ed.) 1969
The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria.
North Holland Publishing Company, Amsterdam
- 20 HAYFLICK, L. and R.M. CHANOCK 1965
Mycoplasma species of man.
Bact.Rev. 29, 185-221
- 21 HERS, J.F.P. and N. MASUREL 1967
Infection with Mycoplasma pneumoniae in civilians in the
Netherlands.
Ann.N.Y. Acad. Sci. 143, 447-460
- 22 KRAYBILL, W.H. and Y.E. CRAWFORD 1965
A selective medium and color test for Mycoplasma pneumoniae
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (N.Y.) 118, 965-970
- 23 KUNDSIN, R.B. and J. PRAZNIK 1967
Pharyngeal carriage of Mycoplasma species in healthy young adults.
Amer.J. Epidem. 86, 579-583
- 24 LAMBERT, H.P. 1968
Syndrome with joint manifestations in association with Myco-
plasma pneumoniae infection.
Brit.Med.Journ.No.5611, 156-157
- 25 LIND, K. 1971
Incidence of Mycoplasma pneumoniae infection in Denmark from
1958-1969.
Acta path.microbiol.scand.section B 79, 239-247

- 26 LIND, K., RAVN, T.J. and J. MOLLER 1970
Occurrence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in patients
hospitalized with acute respiratory illness.
Acta path.microbiol.scand.section B 78, 6-14
- 27 McGEE, Z.A., ROGUL, M. and R.G. WITTLER 1967
Molecular genetic studies of relationships among *Mycoplasma*,
L-Forms and Bacteria.
Ann.N.Y.Acad Sci. 143, 21-30
- 28 MEYERS, B.R. and S.Z. HIRSCHMAN 1972
Fatal infections associated with *Mycoplasma pneumoniae*:
Discussion of three cases with necropsy findings.
The Mount Sinai Journal of Med. 39, 258-264
- 29 MILLER, R.G. 1966
Simultaneous statistical interference.
McGraw Hill, New York
- 30 NEU, H.C. and P.D. ELLNER 1969
Role of *Mycoplasma* in exudative pharyngitis.
N.Y. State J.Med. 69, 3026-3028
- 31 NOCARD, ROUX, BORREL, SALIM-BENIET et DUJARDIN-
BAUMETZ 1898
Le microbe de la peripneumonie.
Ann Inst.Pasteur 12, 240-262
- 32 RIFKIND, D., CHANOCK, R.M., KRAVETZ, K. JOHNSON and
V. KNIGHT 1962
Ear involvement (myringitis) and primary atypical pneumonia
following inoculation of volunteers with Eaton agent.
Amer.Rev.Resp.Dis. 85, 479-489
- 33 SACHS, L. 1971
Statistische Auswertungsmethoden
3. Auflage, Springer, Heidelberg

- 34 SANDERS, D.Y. and H.W. JOHNSON 1971
Stevens-Johnson syndrom associated with Mycoplasma pneumoniae infection.
Amer.J.Dis.Child. Vol. 121, 143-235
- 35 SMITH, P.F. 1971
The Biology of Mycoplasmas.
Academic Press, New York
- 36 SOBESLAVSKY, O., SYRUCEK, L., BRUCKOVA, M. and M. ABRAHAMOVIC 1965
The etiological role of Mycoplasma pneumoniae in otitis media in children.
Pediatrics 35, 652-657
- 37 SOMERSON, N.L., JAMES, W.D., WALLS, B.E. and R.M. CHANOCK 1967
Growth of Mycoplasma pneumoniae on glass surface.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 143, 384-389
- 38 STEELE, J.C., GLADSTONE, R.M., F.C. Fleming 1972
Acute cerebellare ataxia and concomitant infection with Mycoplasma pneumoniae.
J. Pediatrics 80, 467-469
- 39 STERNER, G. and G. BIBERFELD 1969
Central nervous system complications of Mycoplasma pneumoniae infection.
Scand.J. Infedt. Dis. 1, 203-208
- 40 Wissenschaftliche Tabellen Geigy 1969
Documenta Geigy
7. Auflage, Geigy, Basel.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Bredt, danke ich für die Überlassung des Themas und die methodische Hilfe bei dessen Bearbeitung.

Weiterhin danke ich dem damaligen Leiter der Kinderklinik Mainz, Prof. Köttgen, und Oberarzt Prof. Erdmann sowie Herrn Dr. Callensee, Facharzt für Kinderheilkunde in Mainz für die Überlassung des Untersuchungsmaterials.

Lebenslauf

Ich, Winnie Wai Meng Lam, Tochter des Kaufmanns Kai A. Lam und dessen Ehefrau Soy Lau Lam geborene Lee, bin am 12.9.1948 in Hongkong geboren. Im Mai 1957 kam ich als Achtjährige nach Deutschland und besuchte hintereinander die Volksschule in Gelnhausen, Volksschule in Straubing, Musisches Gymnasium in Straubing und das Aufbaugymnasium in Friedberg. Im Juni 1968 legte ich die Reifeprüfung in Friedberg ab. Ich immatrikulierte im Winter-Semester 1968 an der med. Fakultät in der Johannes-Gutenberg Universität Mainz. Am 7.9.1969 erfolgte die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 23.3.1971 die ärztliche Vorprüfung. Das med. Staatsexamen absolvierte ich am 12.6.1974. Ich arbeite seit 5.8.74 in der chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Ingelheim als Medizinal-Assistentin.



